

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152159

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

蛋白质组学技术研究在乐果胁迫下牡蛎生殖腺和鳃差异表达的蛋白质

Differential proteins of gonad and gill tissues revealed with proteomics in *Sscostrea cucullata* under the stress of dimethoate

郭延韩

指导教师姓名: 黄河清 教授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要	1
ABSTRACT	3
1. 前言	5
1.1 有机磷农药概述	5
1.1.1 有机磷农药的污染情况概述	5
1.1.2 有机磷农药生物毒性概述	7
1.2 有机磷农药乐果及其毒性研究概述	9
1.2.1 有机磷农药乐果概述	9
1.2.2 有机磷农药乐果的毒性机制	10
1.2.2.1 引发细胞凋亡	10
1.2.2.2 损伤心血管系统	11
1.2.2.3 生殖毒性	11
1.2.2.4 呼吸系统毒性	12
1.3 牡蛎及其在污染研究中的运用	12
1.4 蛋白质组学技术概述	13
1.4.1 样品制备技术	13
1.4.2 蛋白质分离技术	14
1.4.2.1 双向凝胶电泳(2 -dimentional gel electrophoresis) 技术	14
1.4.2.2 蛋白质芯片技术 (Protein Microarray)	14
1.4.3 质谱分析技术及蛋白质微量测序技术	15
1.4.4 新型蛋白质组学技术	16
1.4.4.1 质谱显像技术	17
1.4.4.2 荧光双向差异凝胶电泳	17
1.4.4.3 多维液相色谱技术	18
1.4.4.4 鸟枪法蛋白质组学	18
1.5 蛋白质组学技术在有机磷农药污染监测方面的应用	19
1.5.1 有机磷农药污染的生理监测方法概述	19

1.5.2 蛋白质组学在有机磷农药污染监测及生物标志物研究方面的应用	21
1.6 本论文研究内容和意义	22
2 材料与方法	24
2.1 材料	24
2.2 仪器与试剂	24
2.2.1 主要仪器设备	24
2.2.2 主要试剂	25
2.3 实验方法	26
2.3.1 乐果残留量的气相色谱分析	26
2.3.2 乐果胁迫下牡蛎组织中CAT和SOD酶活的测定	27
2.3.2.1 乐果各组织的样品制备	27
2.3.2.2 CAT活力的测定 ^[75]	27
2.3.2.3 SOD活力的测定 ^[74,75]	28
2.3.3 蛋白质组学技术研究乐果诱导下牡蛎生殖腺组织鳃组织差异表达的关键蛋白质	29
2.3.3.1 差异蛋白质组学实验步骤	29
2.3.3.2 差异蛋白质的免疫印迹验证	35
2.3.3.3 差异蛋白质的Real Time-PCR验证	38
2.4 数据统计分析	42
3 结果与讨论	43
3.1 乐果胁迫下牡蛎鳃和生殖腺中乐果残留量的测定	43
3.1.1 标准曲线的测定	43
3.1.2 组织中残留量的检测	43
3.2 乐果对牡蛎生殖腺及生殖腺中CAT酶及SOD酶活性的影响	46
3.2.1 乐果对生殖腺组织中CAT酶及SOD酶活性的影响	46
3.2.2 乐果对鳃组织中CAT酶及SOD酶活性的影响	46
3.2.3 乐果胁迫下牡蛎组织抗氧化酶活力变化的原因分析	47
3.3 蛋白质组学技术研究乐果胁迫下生殖腺差异表达的蛋白质	49
3.3.1 乐果胁迫下牡蛎生殖腺的双向电泳及差异蛋白鉴定结果	49
3.3.2 生殖腺差异蛋白mRNA表达量变化的验证	54
3.3.3 乐果胁迫下牡蛎生殖腺的差异蛋白鉴定结果分析	55
3.3.3.1 氧化应激相关的差异蛋白	55
3.3.3.2 能量代谢相关的差异蛋白	56
3.3.3.3 DNA复制及转录相关的差异蛋白	57

3.4 蛋白质组学技术研究乐果胁迫下鳃差异表达的蛋白质	58
3.4.1 乐果胁迫下牡蛎鳃的双向电泳及差异蛋白鉴定结果	58
3.4.2 鳃差异蛋白mRNA表达量变化的验证	64
3.4.3 乐果诱导下牡蛎 14-3-3 蛋白表达量上调的免疫印证	64
3.4.4 乐果胁迫下牡蛎鳃差异蛋白的鉴定结果分析	65
3.4.3.1 氧化应激相关的蛋白	65
3.4.3.2 能量代谢相关差异蛋白	66
3.4.3.3 细胞周期调控过程相关蛋白	67
3.5 乐果对牡蛎毒性的分子机制探讨	69
4 总结	71
5.参考文献	73
缩略语	83

CONTENTS

CHINISE ABSTRACT	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCTION	5
1.1 Overview of Opps	5
1.1.1 Overview of Opps pollution	5
1.1.2 toxicity and biological mechanism of Opps	7
1.2 Overview and biological toxicity of DM	9
1.2.1 Overview of DM	9
1.2.2 Biological toxicity of DM	10
1.2.2.1 Cause cell apoptosis	10
1.2.2.2 Impair cardiovascular system	11
1.2.2.3 Reproductive toxicity	11
1.2.2.4 Respiratory toxicity	12
1.3 Overview of oyster and its applycation	12
1.4 Overview of proteomics	13
1.4.1 Sample preparation	13
1.4.2 Protein separation	14
1.4.2.1 2D-PAGE (2-dimentional gel electrophoresis)	14
1.4.2.2 Protein Microarray	14
1.4.3 Mass analysis	15
1.4.4 New pattern of techonology of proteomics	16
1.4.4.1 Mass spectrometry imaging	17
1.4.4.2 Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis	17
1.4.4.3 Multidimensional liquid chromatography	18
1.4.4.4 Shot-gun proteomics	18
1.5 Application of proteomics for detecting environment pollution	19
1.5.1 Biological dection of environment pollution	19
1.5.2 Application of proteomics in detecting envrinment pollution and finding biomarkers	21
1.6 The content and significance of this paper	22

2 MATERIALS AND METHODS	24
2.1 Materials	24
2.2 Equipment and reagent	24
2.2.1 Main equipments	24
2.2.2 Main reagent	25
2.3 Methods	26
2.3.1 Dimethoate determined by GC	26
2.3.2 CAT and SOD enzyme activities assay	27
2.3.2.1 Sample preparation	27
2.3.2.2 CAT enzyme activities assay	27
2.3.2.3 SOD enzyme activities assay	28
2.3.3 Identification of differentially expressed key proteins induced by DM in gonad of oyster by proteomics technologies	29
2.3.3.1 Main process of proteomics	29
2.3.3.2 Western blotting analysis of differentially expressed proteins	35
2.3.3.3 RT-PCR analysis of differentially expressed proteins	38
2.4 Results analysis method	42
3 RESULTS AND DISCCTION	43
3.1 DM residues in the tissues oyster	43
3.1.1 Preparing the Standard Curve	43
3.1.2 Sample test	43
3.2 Effect of DM on enzyme activities in the gonad and gill of oyster	46
3.2.1 Effect of DM on enzyme activities in the gonad of oyster	46
3.2.2 Effect of DM on enzyme activities in the gill of oyster	46
3.2.3 The cause of enzymeactivities change caused by DM stress	47
3.3 Differentiation proteins of gonad revealed with proteomics in oyster under the stress of dimethoate	49
3.3.12D page and protein analysis results of goand	49
3.3.2 Real Time-PCR analysis of the differentiation protein in the gonad of oyster	54
3.3.3 The analysis of differentiation protein in the gonad of oyster.	55
3.3.3.1 Differentiation protein related to oxidative stress	55
3.3.3.2 Differentiation protein related to energy metabolism	56
3.3.3.3 Differentiation protein related to DNA replication and translation	57
3.4 Differentiation proteins of gill revealed with proteomics in oyster under the stress of dimethoate	58

3.4.1 2D page and protein analysis results of gill	58
3.4.2 Real Time PCR analysis of the differentiation protein in the gill of oyster	64
3.4.3 Western blotting analysis of the differentiation protein 14-3-3	64
3.4.4 The analysis of differentiation protein in the gill of oyster	65
3.4.3.1 Differentiation protein related to oxidative stress	65
3.4.3.2 Differentiation protein related to energy metabolism	66
3.4.3.3 Differentiation protein related to Cell cycle regulation	67
3.5 The molecular toxicity mechanism of the dimethoate	69
4 CONCLUSION	71
5. REFERENCE	73
ABBRRIVATION	83

中文摘要

乐果(Dimethoate,DM)是目前农业生产过程中使用最为广泛的有机磷农药之一。有机磷农药的过度使用造成了严重的环境污染,土壤中残留的有机磷农药可通过河流的扩散作用,最终汇入大海,富集于牡蛎等各种近海养殖水产品体内,并通过食物链途径影响到人类的健康与生存。有机磷农药对人类影响最大是大脑,目前已进行大量科学研究,并有详细的研究报道,但对水生生物的生殖与呼吸系统的毒理学研究并不多。本论文以牡蛎为实验物种,以它的生殖腺和鳃为实验材料,选择 DM 为有机磷农药为污染物和诸多分析技术研究 DM 对牡蛎生殖腺和鳃所产生的毒性效应。

在浓度为 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 5.0 mg/L 乐果,胁迫 48h 的条件下,牡蛎的生殖腺和鳃器官中均能检测出不同浓度的乐果残留量,且组织中乐果残留量随着环境乐果浓度增高而呈现上升趋势。这些现象说明了乐果能够在富集于牡蛎,并迁移且累积在鳃和生殖腺中,影响到鳃和生殖腺执行正常的生理功能,可能诱导出许多应激功能蛋白。对牡蛎鳃和生殖腺中的抗氧化酶过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)酶活性进行分析,实验结果表明,在 2 mg/L 乐果的胁迫下,随着胁迫时间的延长,鳃和生殖腺中的 CAT 酶和 SOD 酶活性都呈现出先上升而后降低的趋势,这说明了乐果能够引发牡蛎的应激反应,使牡蛎鳃和生殖腺中抗氧化酶活性的提高,并引发一系列的后续效应,诱导差异蛋白的产生。

采用蛋白质组学及相关的分析技术筛选出在乐果胁迫前后,牡蛎生殖腺和鳃中表达的应激差异蛋白。在生殖腺中已鉴定出 12 个差异蛋白,其中 9 个蛋白表达量下调,3 个蛋白表达量上调;在鳃中已鉴定出 14 个差异蛋白,其中 11 个蛋白表达量下调,3 个蛋白表达量上调。针对这些差异蛋白的生理功能进行检索比对和文献查阅,总结出主要影响的是参与氧化应激、能量代谢、DNA 复制与转录、细胞周期调控等过程有关重要功能蛋白,其中氧化应激相关的蛋白,如 HSTF 等表达量上调,而 FAD 依赖的氧化还原酶和 Cavortin 表达量却下调。DNA 复制与转录相关蛋白中,AGT 表达量上调, Ribosomal S2 表达量下调。细胞周

期调控相关蛋白 Cdc2 和 Megator 表达量下调, 14-3-3 蛋白表达量上调。能量代谢相关的蛋白中, Malate dehydrogenase 表达量下调, 而 Glutamine synthetase 表达量上调。采用 Real-time PCR 技术进一步佐证 Cavortin、14-3-3、Ribosomal S2, Malate dehydrogenase 等差异蛋白的 mRNA 表达量的变化趋势, 其中这些差异蛋白对应的 mRNA 表达量变化趋势与双向电泳凝胶板上的差异蛋白变化趋势很相似。还选用 Western Blot 技术验证了 14-3-3 蛋白表达水平的上调趋势, 进一步佐证了采用蛋白组学技术筛选出的差异蛋白可信度。

本论文所获得的研究结果有助于进一步深入探索乐果的毒理学机理, 所筛选出来部分差异蛋白(如 14-3-3 和 Carvotin 蛋白), 易于检测, 对乐果效应表现出较高敏感性, 适合作为监测海水中有机磷农药污染程度及产生危害性的生物标记物之一, 具有潜在应用价值。

关键词: 乐果; 蛋白质组学; 生物标记物

Abstract

Dimethoate (DM) is one of the most widely used organ phosphorus pesticides (Opps). Overuse of Opps has caused serious environmental pollution in the environment. Opps in soil was spread by rivers and flowed into the sea finally. Opps can be accumulated in many mariculture products especially the oyster and will be absorbed by human through food chain. However, the researchs about the toxicity of the Opps were mainly carried out in brain, there were still few papers about the reproductive and respiratory toxicity of Opps to Aquatic organisms. This paper used the DM as Opps, and used a series of experimental methods to study the toxicity of DM to gonad and gill of the oyster.

Using 1mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L DM treated oyster for 48 h, the GC results showed that there were varying degree of dimethoate residues in both the gonad and gill of the oyster. The residues of DM increased with the concentration of environmental DM. This result indicates that DM can be accumulated in oyster and diffused into the gill and gonad, and will impair the biological function of gill and gonad and cause many differentiation proteins. Analyzing the CAT and SOD activity of oyster, the results showed that the CAT activity and SOD activity both raised first and then decreased with the time extends. This indicated that DM can trigger the stress response of oyster then triggered a series of subsequent effect, including the generation of the differentiation proteins.

Use the proteomics and related technology to select the differentiation protein in the gill and gonad under DM exposure. There were 12 differentiation proteins in the gonad. Among those differentiation protein, 9 proteins were down-regulated and 3 proteins were up-regulated. There were 14 differentiation proteins in the gill. Among those differentiation protein, 11 proteins were down-regulated and 3 proteins were up-regulated. According to the protein database and related papers, these proteins were related to the oxidative stress, energy metabolism, DNA replication, and cell cycle regulation. Among the proteins related to oxidative stress, HSTF was

up-regulated, and FAD dependent oxidoreductase and cavortin were down-regulated. Among the proteins related to DNA replication and transcription, AGT was up-regulated and Ribosomal S2 was down-regulated. Among the proteins related to energy metabolism, Malate Dehydrogenase were down regulated and Glutamine synthetase were up-regulated. Real-Time PCR was used to further confirm the differentiation proteins such as Cavortin, 14-3-3, and Malate dehydrogenase, the results showed that change trends was almost the same as the trend of 2D PAGE. Use the Western Blotting to detect the up-regulation of 14-3-3, the result further confirmed the differentiation proteins.

Our results can help find out the biological mechanism of the toxicity of DM. Some differentiation protein (Cavortin and 14-3-3) are easy to detect and showed high sensitivity to DM, can be served as the biomarkers for DM and have potential applications.

Key words: Biomarker; Proteomics; Dimethoate

1. 前言

1.1 有机磷农药概述

1.1.1 有机磷农药的污染情况概述

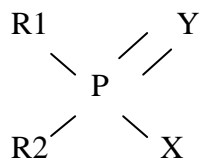
有机磷农药 (Organophosphorus pesticides, Opps) 是一类广泛运用于农业生产中的一类杀虫剂。Opps 属于有机磷化合物的范畴, 一般是指磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酰胺酯类有机磷化合物^[1]。有机磷农药纯品呈白色结晶, 工业品为淡黄色或棕色油状液体, 大多有大蒜味。其分子结构中含有 C-P 键或 C-O-P, C-S-P, C-N-P 键的有机化合物。根据化学键的不同, 有机磷农药可以分为 5 种类型: 磷酸酯类, 一硫代磷酸酯类, 二硫代磷酸酯类, 膦酸和膦酸酯类, 磷酰胺类和硫代磷酰胺类等。由于 Opps 具有药效高, 内吸作用强, 易降解等优点。自 1990 年以来, 全世界有机磷农药的市场占有率达到全部农药的市场占有率 50% 以上^[1,2]。而在我国, 有机磷农药同样被大量应用于农业生产中。数据显示, 有机磷农药占我国所有农药产量的 70% 以上, 而有机磷杀虫剂占有所有杀虫剂的 70% 以上, 其中甲胺磷、甲基对硫磷、对硫磷、久效磷、氧化乐果、敌敌畏等剧毒型有机磷杀虫剂又占杀虫剂的 46%^[3]。由此可见, Opps 在我国已经成为了在农业生产中最为广泛使用的一种农药。虽然 Opps 具有见效快, 降解快的优点, 但同其他类型农药一样, 有机磷农药在环境中同样能够被富集, 并且由于有机磷农药中存在的剧毒品种如甲胺磷, 甲基对硫磷, 久效磷等用量较大, 因此其在环境中的残留以及对农药残留对环境中生物产生的危害同样不容忽视。

农药被喷洒时并不能全部喷洒到植物表面, 而其中大约有 80 % 的农药直接进入环境中。耕地中使用农药首先污染的是土壤。农药通过土壤, 植物根系的吸收作用富集在土壤内部。而土壤中残留的农药可能通过地下水进入河流中, 最终被排放到海洋。而在水田中施用的农药主要会富集在水体中, 并最终通过河流流入大海, 在大海中富集^[1,4]。有机磷农药在水体中的富集很可能对生物体产生十

分不利的影响。自从上世纪八十年代以来,有机磷农药在环境中的残留的相关研究越来越受到重视。相关研究证实,淡水和海水中均存在不同程度的 Opps 污染, Opps 污染主要集中在河流、湖泊、自来水厂源水、井水、地下水等淡水中,报道检出的有机磷农药主要有丙溴磷、敌敌畏、甲基对硫磷、对硫磷、硫磷、水胺硫磷、甲胺磷、甲拌磷、久效磷、二嗪农、乐果、灭杀毙等^[3]。海水中的 Opps 污染程度较之于淡水中更为轻微,然而其影响仍然不容忽视。学者在 Humber 河口地区、California 湾、Indian 河口地区等地均检测出较高浓度的有机磷农药。甚至在北极附近也检测到有机氯农药、多氯联苯以及有机磷农药等农药的残留,特别是有机磷农药的检出,打破了有机磷被认为是一种降解的新生代农药的概念^[5]。由此可见, Opps 可能在海洋中富集,并且通过洋流扩散到世界的各个水体区域,对世界上所有的海洋生物的生存产生巨大威胁。Opps 的残留给我国海洋带来的污染也不容忽视。在我国东部沿海地带,存在着较严重的有机磷农药污染情况。李永玉等对厦门九龙江海域的有机磷农药污染情况进行了检测,结果显示,厦门海域的有机磷农药浓度为 209.96 ng/L-725.54 ng/L, 底层海水有机磷农药浓度为 66.01~200.65 ng/L。敌敌畏、硫磷嗪、甲拌磷、硫特普、乐果、乙拌磷是厦门海域中典型的有机磷农药的污染物。而乐果的含量占总检出有机磷污染物总浓度的 50% 以上^[6]。刘茜等对市场上鲜活水产品体内的有机磷农药残留物进行测定,结果显示,螃蟹、鲫鱼、草鱼、黄鱼、梭子蟹、河虾中均有不同程度的有机磷农药残留^[7]。一般认为,有机磷的生物富集程度不大。但研究表明,有机磷在水生生物体内的蓄积仍不可忽视^[8,9]。对于鱼类来说,鳃是主要的有机磷农药吸收器官,有机磷农药可以通过鱼的呼吸作用进入鱼体内,在体内几个 h 内达到稳态。而对于虾类,有机磷农药主要通过肠壁的吸收作用进入其体内。由此可见, Opps 能够在海水中富集并通过动植物的吸收作用进入海洋生物体内,对海洋生物的健康造成危害。Opps 不仅污染环境危及海洋生物生长和繁殖,最终也可能通过食物链进入人体,进而危害人类健康。

1.1.2 有机磷农药生物毒性概述

有机磷农药绝大多数品种为磷酸酯类化合物，其化学结构通式为：



式中 R1 和 R2 大多数为甲氧基或乙氧基，亦可为苯基或其他基团；Y 一般为氧原子或硫原子；X 为烷氧基、芳香基、卤基或杂环取代基。由于取代的基团不同，可分为多种不同化合物。各种化合物的毒性大小与其化学结构中 R、X、Y 基团的改变有关^[10]。研究表明，有机磷农药可能损伤生物体的各种生理系统，进而对环境中生物的生存产生威胁。有机磷的生物毒性包括神经毒性、氧化应激作用，生殖毒性、损害运动能力等^[11,12,13,14]。

神经毒性是 Opps 引起的最主要毒性效应。Opps 对具备神经系统动物的神经毒作用机理基本相同。其毒性作用包括急性毒性和迟发型毒性两种。急性毒性的机理主要是有机磷的磷原子可以与乙酰胆碱酯酶（Acetylcholinesterase, Ache）酯解部位的丝氨酸上的氧原子结合，形成共价键；同时酯键断裂，磷酰基与 Ache 结合形成磷酰化酶，这时 Ache 分子便失去活性力而不能再催化水解乙酰胆碱（Acetylcholine, Ach），一般将失去活性的磷酰化酶称为中毒酶抑制乙酰胆碱酯酶（Ache），被抑制后的 Ache 失去了水解乙酰胆碱（Ach）的能力，造成由胆碱能神经末梢所释放的 Ach 大量蓄积，Ach 不能被及时分解而在突触间隙内堆积^[15]。

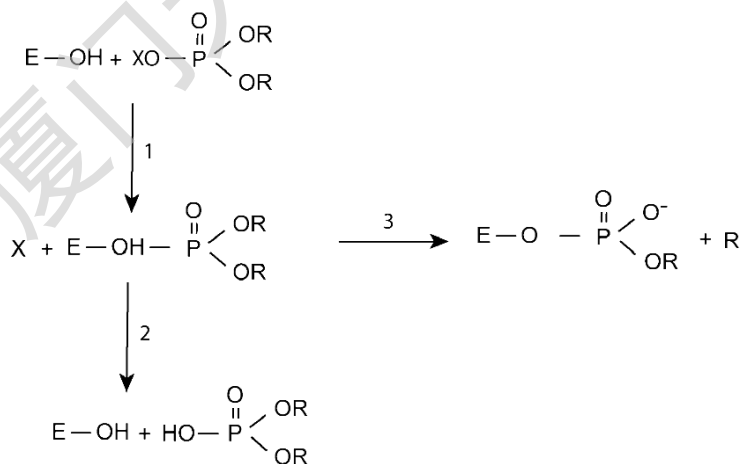


图1. 有机磷与胆碱酯酶间的生化反应方程

Fig.1 The biochemistry reaction between Opps and Ache

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库